様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目： 基盤研究（C）
研究期間： 2007-2008
課題番号： １９５９２３９２
研究課題名（和文） 骨髄間葉系幹細胞と石灰化誘導性複合体応用による新しい歯周組織再生治療法の開発
研究課題名（英文） Periodontal Tissue Regeneration using the Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells with the Calcified-Tissue-Conductive Collagen Composite

研究代表者
藤井 健男 (FUJII TAKEO)
北海道医療大学・大学院歯学研究科・個体差医療科学センター・准教授
研究者番号：３０１７３３８９

研究成果の概要：重度歯周炎によって垂直的・水平的骨欠損を伴う破壊された歯周組織の広範囲な再生を目指す歯周組織再生治療法を確立するために、骨髄間葉系幹細胞培養系を利用する新しい石灰化誘導性複合体型生体素材の開発研究を行った。本研究において、組織再生量の決め手となるコラーゲンゲル 3 次元培養内で、細胞増殖を助長する線維芽細胞成長因子（FGF）を応用することで、石灰化硬組織形成の基盤となる生体材料の開発に一定の目途がついた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 医歯薬学
科研費の分科・細目： 歯学・歯周治療系歯学
キーワード： 歯周外科学・再生治療

１．研究開始当初の背景

現在、行われている歯周組織再生治療は、再生歯槽骨・再生セメント質による歯周組織の三次元的再生を可能にする足場(scaffold)の構築に脆弱性があるため、水平性骨欠損を含む広範囲な歯周組織再生を目指す、安全かつ信頼性の高い再生治療法の要件を十分に満たしていないのが現状である。

本研究の基本的なコンセプトは、以下のとおりである。

ｉ）再生歯周組織の三次元的構築のための恒常的足場(scaffold)として、石灰化誘導活性を有するホスホホリンと生体親和性を示すコラーゲンとの複合体を提供する。

ⅱ）歯周組織を構成する細胞の三次元配置を行うための細胞増殖を統御する rhbFGF を応用したホスホホリン/コラーゲン複合体型生体素材を活用する。

ⅲ）骨髄間葉系幹細胞培養系を利用する石灰化誘導性複合体型生体素材を開発し、安全かつ確実性の高い新しい歯周組織再生医療を目指す。

２．研究の目的

重度歯周炎によって垂直的・水平的骨欠損を伴う破壊された歯周組織の広範囲な再生

を目指す歯周組織再生治療法を確立するために、新機軸の rhbFGF/ホスホホリン/コラーゲン複合体による石灰化誘導性生体素材における骨髄間葉系幹細胞の動態を組織細胞学的見地から評価し、組織再生のメカニズムを細胞シグナル伝達系の解析を通じて、臨床応用への可能性を探求することである。

本研究では、コラーゲンゲル 3 次元細胞培養における FGF の効果について検討を行った。

３．研究の方法

１）材料

(1)被験物質

basic FGF（以下 FGF；科研製薬㈱, Lot.No. 80HCC）原液（10 mg/mL）を蒸留水にて，100，1000，10000 倍希釈して増殖培地に 0.1 v/v%添加した(終濃度：100，10 および 1 ng/mL)。

(2)使用細胞

マウス骨髄細胞培養キット（㈱プライマリーセル：Lot.No.HF3B-1）を用いた。

(3)使用培地

マウス骨髄細胞培養用メディウム（以下メディウム；㈱プライマリーセル），Lot.No. 080627 を用い，デキサメサゾンを 10^{-7} M，β グリセロホスフェイトを 10 mM添加して増殖培地とした。さらにこの培地にアスコルビン酸を 172.7 μM（50 μg/mL）添加したものを分化培地とした。

(4)DNA の定量

DNA 定量キット（㈱プライマリーセル：Lot No.HDP）を使用した。

(5)カルシウム量の定量

カルシウム E-テストワコー（和光純薬工業㈱：Lot No.AR987）を使用した。

(6)ALP 活性の測定

ALP カイノス（㈱カイノス：Lot No.825）を使用した。

(7)培地添加成分

ⅰ）L-アスコルビン酸りん酸エステルマグネシウム塩 n 水和物（和光純薬工業㈱：Lot No.LTH7700）

ⅱ） Dexamethasone, minimum 98% HPLC（SIGMA：Lot No.096K1805）

ⅲ） β-GLYCEROPHOSPHATE Disodium Salt Hydrate（SIGMA：Lot No.85H5718）

ⅳ）コラーゲン溶液（KOKEN CELLGEN 酸性溶液 I-PC：Lot.No.118064）

２）培養方法

被験物質を規定濃度に，コラーゲン溶液を 50v/v%に調製した増殖培地に，マウス骨髄細胞を細胞密度 3.0×10^{4} cells/0.5mL/well で 24 穴プレートに播種し，1 時間程度 5%CO_2，37℃のインキュベータ内でゲル化するまで静置した。ゲル化確認後，被験物質を規定濃度に調製した増殖培地を 0.5 mLずつ静かに添加した。

(1) 培養 1 週間終了群

培養開始後，培養 0 日、培養 4 日目に被験物質を規定濃度に調製した増殖培地に交換し，10 日（培養 7 日目）に PBS 0.5 mL にて洗浄・吸引除去し，細胞を well よりパスツールスクレーパーにて剥離し，PBS 0.5 mL を加えて細胞を回収し，合わせて 1 mL の細胞回収液とした。回収した細胞は各項目定量まで-80℃で保存した。

(2) 培養 3 週間終了群

培養開始後，培養 0 日、培養 4 日目に被験物質を規定濃度に調製した増殖培地に交換し（上清は毎交換時に回収），培養 7 日目に分化培地に交換した．その後，週 2 回（月・木）の頻度で分化培地に交換し，培養 21 日目に培地を回収後，PBS 0.5 mL にて洗浄・吸引除去し，細胞を well よりパスツールスクレーパーにて剥離し，PBS 0.5 mL を加えて細胞を回収し，合わせて 1 mL の細胞回収液とした。回収した細胞は各項目定量まで-80℃で保存した。

(3)各項目定量

回収した細胞を超音波破砕（30 秒間）し，遠心分離（10,000 rpm，4℃，5 分間）にかけ上清を回収した．回収した上清は，ALP 活性測定をキットの取扱説明書に従って行なった．また，沈渣は 0.2N の HCl 300 μL を加えピペッティングし，Ca 濃度測定及び DNA の定量を行なった。反復数 3（n=3）。

(4)形態観察

培養中の顕微鏡観察は，被験物質添加日から 1 週間ごとに最終日まで行い，代表例について位相差レンズによる写真撮影を行った。

４．研究成果

１）DNA 量

FGF添加 1 週、3 週の各濃度群において、コントロール群と比較して，多重比較検定（Dunnett法：両側検定）で有意差を認めなかった(図 1)。

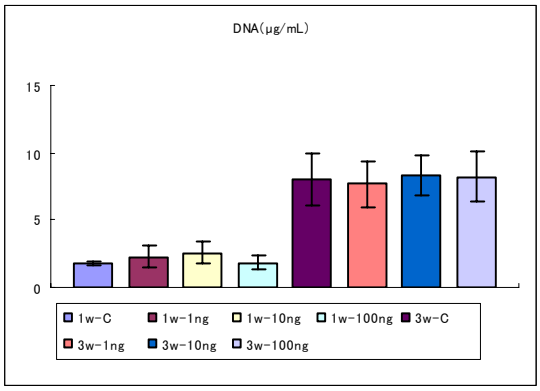


図 1．DNA 量の比較

２）Ca 濃度

培養 1 週後、各濃度のFGF添加群においてCa

量はほぼ検出されなかった。培養 3 週後、FGF 添加群は濃度依存的にCa量が減少する傾向を示し、培養 3 週の 10ng群、100ng群は、3 週コントロール群と比較して，多重比較検定（Dunnett法：両側検定）で有意に低い値を示した（$p<0.05$）。（図２）。

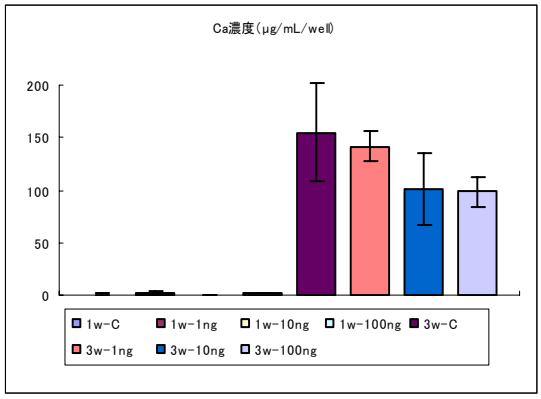


図２．Ca 量の各群間の比較

３）ALP 活性

培養 1 週、3 週におけるALP活性は、FGF添加 10ng群および 100ng群でコントロール群と比較して，多重比較検定（Dunnett法：両側検定）の結果、有意に低い値を示した（$p<0.01$）。とくに培養 3 週ではFGF濃度依存的にALP活性は低下した(図３)。

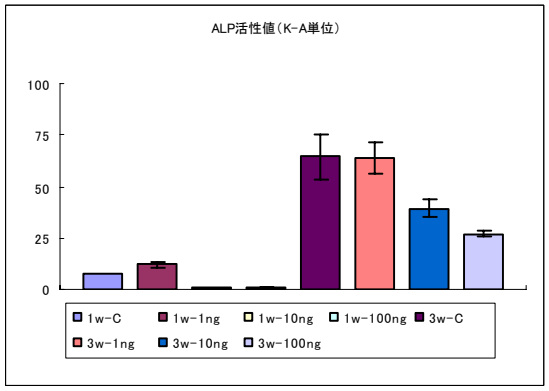
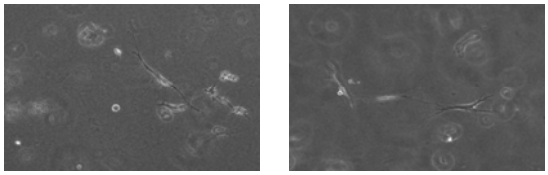


図３．ALP 活性の各群間の比較

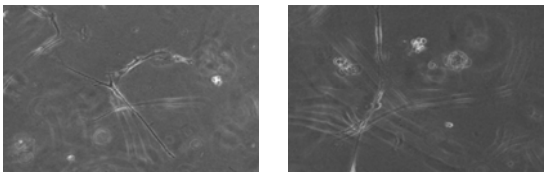
４）形態観察

(1) 培養 1 週

コラーゲンゲル 3 次元培養 1 週目において、骨髄間葉系細胞群は、コントロール群と比較して、各 FGF 添加群とも紡錘状に伸展し形態的な差異は認められなかった(図４)。



コントロール群　　FGF 1ng 群

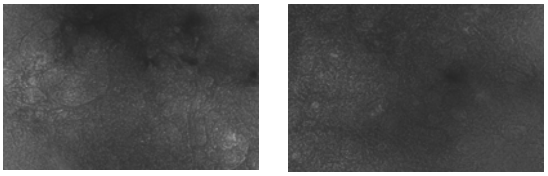


FGF 10ng 群　　FGF 100ng 群

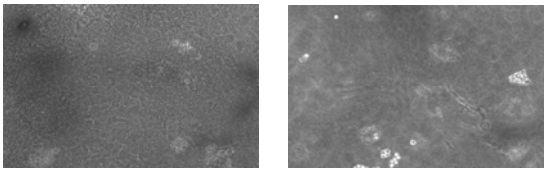
図４．コラーゲンゲル 3 次元培養(1 週)

(2) 培養 3 週

培養 3 週において FGF 添加各群の細胞形態に差異は認められず、3 次元培養条件下でいずれも良好な細胞増殖を認めた(図５)。



コントロール群　　FGF 1ng 群



FGF 10ng 群　　FGF 100ng 群

図５．コラーゲンゲル 3 次元培養(３週)

５）まとめ

重度歯周炎によって垂直的・水平的骨欠損を伴う、破壊された歯周組織の広範囲な再生を目標とする、新しい歯周組織再生治療法を確立するために、骨髄間葉系幹細胞培養系を応用する新規石灰化誘導性複合体型生体素材の開発研究を行った。

FGF 添加コラーゲン 3 次元ゲル細胞培養系において、骨髄間葉系幹細胞は十分な増殖を示し、3 次元コラーゲンゲル培養系は、組織再生量を制御する scaffold の構築が可能であると考えられた。

コラーゲン 3 次元ゲル培養 3 週目の ALP 活性は、FGF 添加により濃度依存的な低下を示した。これは FGF の影響による細胞増殖が 3 週までの早期に生じ､培養 3 週の時点ではFGF 添加 10ng 群および 100ng 群で石灰化指標の一つである ALP 活性は既にピークを過ぎたものと考えられる。Ca 量においてはその差が顕著に認められず、コラーゲン 3 次元ゲル細胞培養系内での石灰化組織を形成するために、今後は石灰化誘導性を担保するリン酸基供給源としてのホスホホリンの役割を探索する予定である。

本研究において、組織再生量の決め手となるコラーゲンゲル 3 次元培養内で、細胞増殖を助長する線維芽細胞成長因子（FGF）を応用することで、石灰化硬組織形成の基盤となる生体材料の開発に一定の目途がついた。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計３件）

1) A.Tamura, T.Ara, Y.Imamura, T.Fujii P-L.Wang. The effects of antibiotics on in vitro biofilm model of periodontal disease. Eur J Med Res; 13, 439-445, 2008.
2) M.Kitamura, K.Nakashima, Y.Kowashi, T.Fujii, H.Shimauchi, et al. Periodontal Tissue Regeneration Using Fibroblast Growth Factor-2: Randomized Controlled PhaseⅡClinical Trial. ProsOne; 3, 1-11, 2008.
3) FUJII Takeo, TSUJI Hifumi. Antibiotic strategies for the treatment of periodontal disease. Clinical Research in Dentistry; 5, 54-65, 2008.

〔学会発表〕（計２件）

1) T.Fujii, T.Lombardi, P.C.Baehni, et.al. Application of Phosphophoryn/collagen composite to horizontal bone loss in periodontal defects in vivo. 34th European Calcified Tissue Society; 2007.
2) T.Fujii, P-L Wang, Y.Terada, H.Tsuji, PC Baehini. Effects of Melatonin on Pro-inflammatory Cytokine Production in PGE2-activated Human Gingival Fibroblasts *in vitro.* 35th European Calcified Tissue Society; 2008.

６．研究組織

(1)研究代表者

藤井　健男（FUJII TAKEO）
北海道医療大学・大学院歯学研究科
個体差医療科学センター・准教授
研究者番号：３０１７３３８９

(2)研究分担者

斎藤　隆史（SAITO TAKASHI）
北海道医療大学・大学院歯学研究科
う蝕制御治療学分野・教授
研究者番号：４０２６５０７０

安彦　善裕（ABIKO YOSHIHIRO）
北海道医療大学・大学院歯学研究科
個体差医療科学センター・教授
研究者番号：９０２６０８１９

齋藤　正人（SAITO MASATO）
北海道医療大学・大学院歯学研究科
個体差医療科学センター・講師
研究者番号：５０３３７０３６